中国光学（中英文） Chinese Optics 核心期刊

流动相单分子免疫检测系统的设计

胡鹏涛 高若谦 葛明锋 董文飞 李力 苏新然

Design of flow-phase single-molecule immunoassay detection system

HU Peng-tao, GAO Ruo-qian, GE Ming-feng, DONG Wen-fei, LI Li, SU Xin-ran

引用本文:
胡鹏涛, 高若谦, 葛明锋, 董文飞, 李力, 苏新然. 流动相单分子免疫检测系统的设计[J]. 中国光学, 2025, 18(5): 1055-1065. doi: 10.37188/CO.2025-0045
HU Peng-tao, GAO Ruo-qian, GE Ming-feng, DONG Wen-fei, LI Li, SU Xin-ran. Design of flow-phase single-molecule immunoassay detection system[J]. *Chinese Optics*, 2025, 18(5): 1055-1065. doi: 10.37188/CO.2025-0045

在线阅读 View online: https://doi.org/10.37188/CO.2025-0045

文章编号 2097-1842(2025)05-1055-11

流动相单分子免疫检测系统的设计

胡鹏涛[1,2], 高若谦[1*], 葛明锋[1], 董文飞[1,2], 李 力[1], 苏新然[1,2]
（1. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 江苏 苏州 215163;
2. 长春理工大学 机电工程学院, 吉林 长春 130022）

摘要: 为实现肿瘤标志物的早期诊断, 本文设计了一种适用于流动相样本的单分子免疫检测系统, 并对其光学荧光成像平台及图像检测计数算法进行了研究。首先, 为满足低浓度、高通量样本的即时检测需求, 提出了一种基于流动相的单分子免疫检测方法。其次, 结合微流控芯片的规格要求, 设计了一套光学荧光成像检测平台, 通过滤光和分光元件的合理配置, 利用多模块集成实现荧光样本的高分辨率成像。最后, 在离焦粒子的图像检测计数算法的基础上, 优化了特征匹配方法, 以高效处理非焦面荧光粒子信号。实验结果表明, 本系统在单分子免疫标志物样本检测中的下限可达到 0.001 pg/mL, 在 0.001 ~ 1 pg/mL 的理论检测范围内, 变异系数均小于 10%, 可在一小时内完成最多十份样本的检测。本系统满足了单分子免疫检测的稳定性、高灵敏度和高通量检测需求, 在癌症早期筛查领域具有重要的应用前景。

关 键 词: 早期诊断; 单分子免疫检测; 荧光成像; 光学平台; 特征匹配
中图分类号: O439 **文献标志码:** A **doi:** 10.37188/CO.2025-0045 **CSTR:** 32171.14.CO.2025-0045

Design of flow-phase single-molecule immunoassay detection system

HU Peng-tao[1,2], GAO Ruo-qian[1*], GE Ming-feng[1], DONG Wen-fei[1,2], LI Li[1], SU Xin-ran[1,2]
（1. *Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou* 215163, *China*;
2. *School of Mechanical and Electrical Engineering, Changchun University of Science and Technology, Changchun* 130022, *China*）
* *Corresponding author, E-mail: gaorq@sibet.ac.cn*

Abstract: We develop a single-molecule immunoassay detection system for flow-phase samples to enable early diagnosis of tumor biomarkers. The system includes an optical fluorescence imaging platform and an image processing algorithm. First, we developed a flow-phase single-molecule immunoassay detection method suitable for real-time detection of low-concentration, high-throughput samples. Second, we designed a set of fluorescence imaging detection platform compatible with microfluidic chips. Through the rational configuration of optical filters and beam splitters, high-resolution fluorescence imaging was achieved by utilizing

收稿日期: 2025-03-14; **修订日期:** 2025-04-02
基金项目: 国家重点研发计划（No. 2022YFC2403502）; 吉林省与中国科学院科技合作高新技术产业化专项资金项目（No. 2023SYHZ0037）; 山东省青年自然科学基金项目（No. ZR2023QF136）
Supported by the National Key R&D Program of China (No. 2022YFC2403502); Science and Technology Cooperation Special Project, Jilin Province and Chinese Academy of Sciences (No. 2023SYHZ0037); Shandong Provincial Natural Science Foundation, China (No. ZR2023QF136)

multi-module integration. Finally, based on the image detection and counting algorithm for out-of-focus particles, we optimized a feature-matching algorithm to effectively detect out-of-focus fluorescent particles. Experimental results demonstrate a detection limit of 0.001 pg/mL within a linear range of 0.001−1 pg/mL, with coefficient of variation below 10%. The system can process up to 10 samples per hour. These findings indicate that our system meets the requirements for stable, sensitive, and high-throughput single-molecule immunoassay detection, showing promising potential for early cancer screening.

Key words: early diagnosis; single-molecule immunodetection; fluorescence imaging; optical platform; feature matching

1 引 言

随着疾病诊断技术的不断发展，精准医疗已成为前沿研究领域，其中生物分子的高灵敏度定量检测在疾病诊断中发挥着至关重要的作用。然而，传统免疫学检测方法，如酶联免疫吸附法（ELISA）和化学发光法（CL），其检测灵敏度多限制在 10^{-14} ~ 10^{-12} mol/L，难以满足疾病早期诊断的需求[1]。尤其是在对早期疾病标志物诊断时有高灵敏度、低成本及高通量检测需求，单分子免疫检测技术因其超高的灵敏度和特异性，逐渐成为肿瘤等重大疾病早期诊断的重要工具[2]。单分子免疫检测通过将免疫复合物限定在极小的检测体积内，并对产生的信号进行绝对计数，实现了“数字化”免疫检测[3]。该技术的检测灵敏度可达 10^{-18} mol/L，可以精准检测出极低浓度的单分子免疫标志物，从而满足早期疾病诊断的需求[4]。

单分子免疫检测可分为原位检测与随机分配检测两类[5]。原位检测采用高灵敏度检测设备在固定区域读取免疫复合物的信号，如采用基于电传感器[6]或超高分辨率近场扫描显微镜[7]。尽管原位检测具有极高的灵敏度，但其成本较高、信号易受干扰且对操作者的技术要求较高，限制了其在临床中的广泛应用。而随机分配检测是通过将免疫复合物随机分配到设定的检测区域进行信号读取，包括基于微阵列芯片和微液滴技术两种方式[8]。微阵列技术通过在毫米级芯片上制造成千上万的微米级微井，将捕获有免疫复合物的磁珠分配至单个微井中[9]，再利用高分辨率荧光显微镜进行荧光点计数。微液滴技术则通过特殊设计的微流道，将流动相样本分割成极小的液滴，并利用流动剪切力和表面张力进行检测。

基于微阵列芯片的单分子免疫检测技术已实现商业化，并成为主流检测技术。Quanterix 公司推出的 Simoa 系统便是一种典型的微阵列芯片技术[10]，能够在一小时内完成多个样本的检测，并支持最多 6 种不同靶标的平行测定，显著提升检测通量与效率。Simoa 在肿瘤免疫标志物检测中的检测下限可达 0.005 ~ 0.01 pg/mL，成为当前单分子免疫检测的金标准[11]。而国内主要停留在实验室科研层面，其应用发展尚面临着许多挑战[12]，在单分子免疫检测的基于芯片技术与非芯片技术方面，面临多种动态分辨的瓶颈，对高精度仪器的需求限制了该技术的大范围发展和应用[13]。

当前的单分子免疫检测设备仍存在一些亟待解决的问题。如灵敏度较低[14]、检测通量较低[15]、检测流程不连续以及检测操作方式繁琐等[16]。针对这些局限性，本文提出了一种基于光学荧光成像的流动相单分子免疫检测方法，将含有单分子免疫标志物的流动相样本以恒定速率注入微流控芯片的流道，利用光学荧光成像平台观测流道中的荧光粒子，并进一步优化特征匹配方法和目标检测算法，从而实现对采集图像信号中荧光粒子的精准检测与计数，检测流动相中的单分子免疫标记物。实现了对低浓度样本的高灵敏度、即时检测需求。

2 流动相单分子免疫检测系统的设计

2.1 流动相单分子免疫检测系统的构成

图 1 为流动相单分子免疫检测系统。它主要由光学荧光成像系统（照明模块、成像模块）、机械运动系统（样本台模块、注射模块）、成像检测计数系统（图像采集模块、图像处理模块）以及计算机等组成。照明模块由光源、聚焦透镜、荧光

滤光片等组成, 成像模块由物镜、CMOS 相机等组成。样本台模块由样本台、X/Z 轴运动电机、单片机、驱动器等组成。注射模块由高精度注射泵与泵管组成。在进行单分子免疫样本检测时, 计算机通过上位机程序控制各个模块间的协调工作, 以实现系统的精准检测与高效运行。

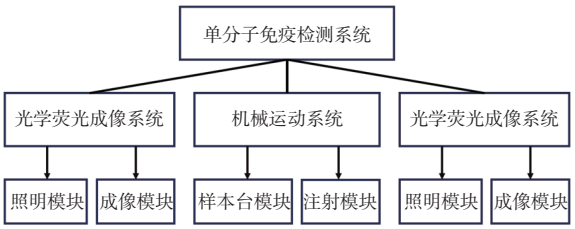


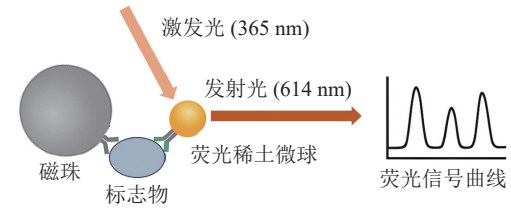
图 1　单分子免疫检测系统的构成

Fig. 1　Components of the single-molecule immunoassay detection system

2.2　光学荧光成像平台的工作原理

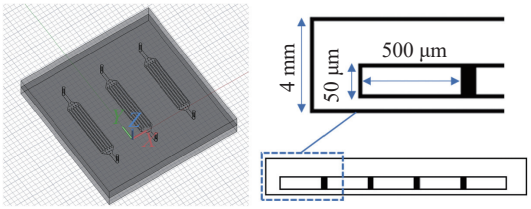
本文采用新型稀土铕(Eu)纳米微球粒子对单分子免疫标志物进行标记, 该样本具有发光强度大、斯托克斯位移较大等优势, 粒子的直径为 1 μm, 激发波长为 365 nm, 发射波长为 614 nm[17]。以肿瘤标志物(例如前列腺特异性抗原 PSA)为例, 首先使用含有 PSA 抗体的磁珠(商用试剂)捕获目标标志物。随后, 加入修饰了另一种 PSA 抗体的荧光稀土微球, 形成“磁珠-标志物-荧光稀土微球”夹心复合物, 如图 2(a)所示。接着, 将该复合物注入微流控芯片, 通过流道实现其单分散平铺。利用激光照射流道, 激发稀土微球发射荧光信号, 通过单颗粒荧光信号计数, 并参考标准曲线, 实现对目标标志物的高灵敏度检测。系统采用的微流控芯片的规格如图 2(b)所示, 其孔道宽度为 500 μm、深度为 50 μm 和长度为 15 mm。这种流道结构确保了样本在芯片内的均匀分布与稳定流动。

在光学荧光成像系统中, 单分子免疫检测系统的光学荧光成像光路如图 3 所示。其工作原理如下: 照明光源发出的光束首先经准直透镜准直, 转换为平行光束, 以确保光束在空间上均匀分布。准直后的光束经聚焦透镜汇聚至激发滤光片上, 选取特定波长的光以匹配荧光标记物的吸收光谱, 确保激发光的单色性和有效性。经过激发滤光片后的光束入射至二向色镜, 并被其反射至物镜的入射区域, 使激发光能够有效进入微流控芯片内。激发光经物镜聚焦后, 均匀照射流道中的样本, 荧光标志物吸收激发光后发射出较长波长的荧光信号, 荧光信号经物镜收集, 并透过二向色镜, 使其有效分离出不同波长的光信号。随后, 荧光信号通过发射滤光片, 选择性透过目标荧光信号, 并有效阻隔短波长的激发光, 以提高检测的信噪比。最终, 经过滤波与优化的荧光信号由管镜聚焦至 CMOS 相机的像元, 转换为电信号, 并实时存储至计算机进行后续数据分析与处理。



(a) “磁珠-标志物-荧光稀土微球”示意图

(a) Schematic diagram of magnetic bead-biomarker-fluorescent rare earth microsphere



(b) 微流控芯片流道示意图

(b) Schematic diagram of the microfluidic chip channel

图 2　单分子免疫样本与微流控芯片示意图

Fig. 2　Schematic of the single-molecule immune samples integrated with a microfluidic chip

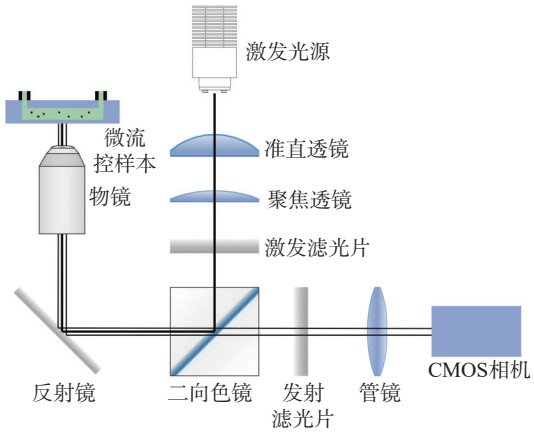


图 3　光学荧光成像系统光路示意图

Fig. 3　Optical path diagram of the fluorescence imaging system

在机械运动系统中, 样本台模块通过 XZ 轴运动电机精确调控样本位置, 确保样本在成像区域内保持稳定, 并能够根据需要进行精确定位。单片机与驱动器相配合, 使样本台模块能够快速响应计算机的控制命令, 进行所需的运动调节。

注射模块则通过高精度注射泵与泵管，将含有单分子免疫标志物的流动相样本注入微流控芯片的流道中。注射泵可实现稳定的流速控制，保证样本在流道内均匀分布。

2.3 系统设计与参数分析

为了确保系统获得均匀的光照效果，照明系统采用科勒照明原理进行设计。科勒照明能够在样本物面上实现光照的高均匀性，最大程度地减少光照不均带来的影像质量差异。该设计可以有效激发样本中的稀土荧光粒子，增强其发射信号，从而提升传感器的信号接收效率，最终提高成像系统的灵敏度和分辨率。

根据稀土粒子样本以及微流控芯片的参数，对系统选取元件进行分析。在照明光路中，激发光源选用输出波长为 365 nm 的 LED 实验光源；核心分光滤光模组中，发射滤光片是中心波长为 365 nm 的 EX615-20，激光滤光片是中心波长为 615 nm 的 EM615-20，二向色镜是截止波长为 400 nm 的长波通二向色镜。

在成像光路中，物镜选取数值孔径为 0.60 的 40 倍平场荧光物镜，并配合 200 mm 的管镜。根据系统分辨率要求及电子性能要求，选择了一款 CMOS 传感器作为成像器件。该器件图像传感器对角线尺寸为 18.8 mm，像元尺寸为 6.5 μm×6.5 μm，像素数为 2048 pixel×2048 pixel。在完成元件选型后，对光学系统进行参数分析。

(1) 成像分辨率

光学系统的分辨率反映了成像系统分辨物体细节的能力，是衡量光学系统成像质量的一个关键指标。根据瑞利判据公式计算，其表达式为：

$$d = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad , \tag{1}$$

其中λ是发射光波长，NA是物镜的数值孔径。计算得到本系统的极限分辨率约为 0.624 μm，待观测粒子的直径为 1 μm，因此系统设计满足分辨率要求，能够清晰成像。

(2) 调制传递函数

调制传递函数是评价成像系统性能的重要指标，反映了各频率经光学系统后对比度下降的情况。根据奈奎斯特频率公式，其表达式为：

$$f_{\mathrm{Nyquist}} = \frac{1}{2p} \quad . \tag{2}$$

已知系统的像方截止空间频率为 76.9 lp/mm。为了得到较好的设计结果，并考虑透镜加工时的误差，成像系统在截止空间频率处的 MTF 需大于 0.3。

(3) 成像系统景深

成像系统的景深是指能清晰成像的远、近物平面之间的距离，即系统调焦至某一对准平面上时，在对准平面前和后一定范围内物体也能清晰成像。根据成像系统的景深公式，其表达式为：

$$\mathrm{DOF} = \frac{2n\lambda}{NA^2} + \frac{2ne}{NA^2} \quad , \tag{3}$$

其中 e 为荧光粒子模糊圆直径大小，值为 1 μm，折射率 n 为 1。系统的近景深与远景深表达式为：

$$\Delta_1 = \frac{2n\lambda}{\mathrm{NA}^2} \quad , \tag{4}$$

$$\Delta_2 = \frac{2ne}{\mathrm{NA}^2} \quad , \tag{5}$$

从而得到本系统的景深为 8.967 μm。

2.4 整机系统

根据 2.3 节中的参数分析与选型，设计了流动相单分子免疫检测系统的整机结构，如图 4 所示。系统配置了 Harvard Pump 系列注射泵，结合精确配套的注射器，其稳定精度可达±5%，确保微流控芯片中低浓度样本的高通量、稳定进样，并保证样本在流道内的均匀分布。此外，Z 轴样本台的运动由 Liko G0601 步进电机驱动，其最小步进为 5 μm，满足后续图像标定与定位需求。本系统通过恒定速率将含有单分子免疫标志物的流动相样本注入微流控芯片的流道，并在光学荧光成像平台支持下，实时观测流道中荧光粒子并计算其数量与免疫标志物浓度。

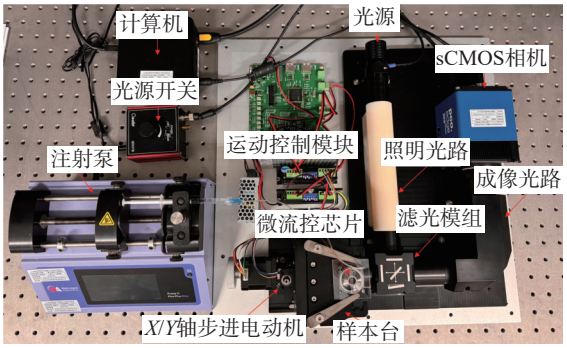


图 4 单分子免疫检测系统整机

Fig. 4 Integrated single-molecule immunoassay detection system

3　成像检测系统的设计

3.1　成像检测算法基本原理

本文设计的流动相单分子免疫检测系统为单相机光学系统, 由于粒子均匀分布在一个体积为 V 的待观测空间内, 并处在与相机光轴 z 轴不同的平行线上, 体现在采集图像上为若干散焦粒子组成的二维图像。为优化散焦粒子的图像质量, 提高荧光样本的检测精度与检测速度, 本文利用一种针对散焦粒子的检测识别算法(General defocusing particle tracking, GDPT)进行单分子免疫成像检测[18]。GDPT 的应用有效地提高了图像的检测分辨率, 降低了低浓度高通量样本的即时漏检率。

理想的光学系统中, 待观测样本中荧光粒子颗粒直径相同,且均匀散布在微流道芯片的整个流道内。待观测区域内的所有荧光粒子都被光源均匀照射, 激发出等量的发射光。受成像系统景深与像差等因素影响, 单相机系统采集图像中荧光粒子的轮廓大小与荧光强度会随着物平面的高度大小发生变化, 并在观测过程中产生一定的偏差[19]。荧光粒子的成像原理如图 5 所示。

轮廓大小的变化, 由于不同的粒子处在待观测空间的不同高度, 且系统在成像方面有一定的像差, 所以在成像过程中具有一定的散光特征。散光导致粒子图像呈椭圆形状, 半长轴和半短轴的长度取决于粒子的空间中的深度分量[20]。

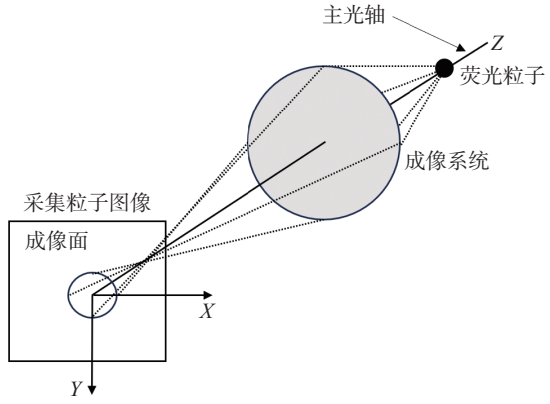


图 5　粒子成像原理示意图

Fig. 5　Schematic diagram of particle imaging principle

图像荧光强度方面, 受光学成像系统景深的限制, 在成像过程中, 粒子图像的强度将发生一定变化, 因此不同高度上的粒子图像信噪比也不同。Olsen 和 Adrian[21] 提出了相关深度(DOC)测量值模型。该模型限制了深度分辨率, 其表达式为:

$$DOC = 2z_{\mathrm{corr}} \quad , \tag{6}$$

$$z_{\mathrm{corr}} = 2\left\{\frac{1-\sqrt{\varepsilon}}{\sqrt{\varepsilon}}\left[f^{\#2}d_{\mathrm{p}}^2 + \frac{5.95(M+1)^2\lambda^2 f^{\#4}}{M^2}\right]\right\}^{\frac{1}{2}}, \tag{7}$$

其中 $f^{\#}$ 为透镜焦距, d_{p} 为粒子直径, M 为系统放大倍数, 参数 ε 通常为 0.01。代入上述参数可得到 z_{corr} 为 115.74 μm, 则本系统相关深度的有效测量值为 231 μm。

3.2　成像检测算法原理

首先建立光学成像系统坐标系, 如图 6 所示。系统坐标系为垂直于相机光轴的平面坐标轴 x, y 和平行于光轴的坐标轴 z。在流道空间 V 内设置图像检测算法积 $V_{\mathrm{c}} = l \times w \times h$。图像平面坐标系为 X 与 Y。在测量体积 V_{c} 中, 包含 N_{p} 个均匀分布的荧光粒子, 系统坐标系中粒子坐标为(x,y,z), 粒子坐标表达式为:

$$x_i, y_i, z_i, \quad i = 1, 2, \cdots N_{\mathrm{p}} \quad , \tag{8}$$

其中, $l \times w$表示光学成像系统的视场大小, 通过系统放大倍数与传感器像元尺寸计算得到视场大小为 330 μm×330 μm。观测深度 h 的大小由粒子尺寸与成像系统参数决定, 而本文微流控芯片的流道高度为 50 μm, 故 h 取值为 50 μm。

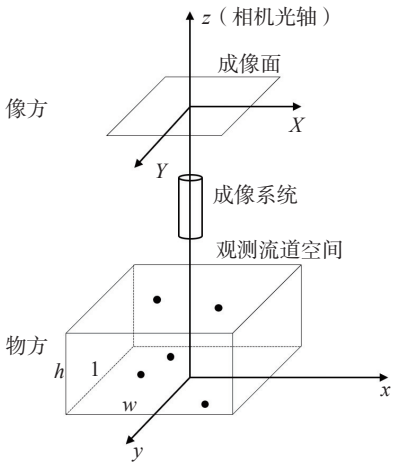


图 6　光学系统成像坐标系示意图

Fig. 6　Schematic diagram of the optical imaging coordinate system

此时，观测体积中的 N_p 个荧光粒子被记录在平面图像内。假设在一个没有畸变的理想光学系统中，包含 N_p 个荧光粒子的采集图像的像函数 $I(X,Y)$表达式为：

$$I(X,Y)=\sum_i I_c(X-Mx_i,Y-My_i,z_i)+I_0(X,Y), \quad (9)$$

其中$I_0(X,Y)$为背景强度与热噪声等观测因素值。

基于归一化互相关函数校准模型设计采集图像的特征匹配算法。利用归一化互相关函数用于评价目标图像与校准图像之间的相似性，其表达式为：

$$c(u,v)=\frac{\sum_{X,Y}\left[I_c(X,Y)-\bar{I}_c\right]\left[I_t(X-u,Y-v)-\bar{I}_t\right]}{\left\{\sum_{X,Y}\left[I_c(X,Y)-\bar{I}_c\right]^2\sum_{X,Y}\left[I_t(X-u,Y-v)-\bar{I}_t\right]^2\right\}^{\frac{1}{2}}}, \quad (10)$$

其中(u,v)为图像平面中的坐标，$I_t(X,Y)$为目标粒子图像，$I_c(X,Y)$为校准粒子图像，$\bar{I}_t$与$\bar{I}_c$为I_t与I_c粒子图像的平均强度，相关函数$c(u,v)$会在I_t与I_c最匹配的位置出现一个最大的峰值 C_m。这个峰值表示相关性。在目标特征匹配过程中通过图像中粒子与背景的信噪比大小来划分粒子的边界，其表达式为：

$$\mathrm{SNR}=\frac{\mu_p}{\sigma_I}, \quad (11)$$

其中μ_p为粒子图像区域去除背景影响后的净平均信号强度，σ_I为图像中无粒子的背景区域的标准差，进一步增强算法的鲁棒性。

流动相样本通过微流控芯片的流道时，较低的流速会导致系统的检测通量下降，从而降低检测效率；较高的流速会导致采集数据信噪比下降，荧光粒子的平均信号强度μ_p与其曝光时间内运动区域有关，其表达式为：

$$\mu_p=K\frac{\sum_i I_c(X-Mx_i,Y-My_i,z_i)}{vt}, \quad (12)$$

其中，K 为系统决定的固定值，v为荧光粒子的流动速度，t 为曝光时间，当成像系统的曝光时间为固定值时，平均信号强度大小与流速成反比，且背景强度与热噪声$I_0(X,Y)$的强度不变。当流速过快时会使粒子信号信噪比降低且产生一定的拖影，从而影响检测精度，故通过合理设置采集荧光粒子图像信噪比阈值，结合实验分析可得到合理的流速检测范围，为 0.5 ~ 2 uL/min。

3.3 成像检测算法处理流程

校准映射粒子图像离散数据。算法流程如图 7 所示。对采集图像数据进行预处理，利用信噪比与相关性分割荧光粒子图像的边界。通过控制位移台在不同高度上获得待检测的校准图像离散数据。将分割后含有单粒子校准信息的 N_{sub} 与经校对的单粒子散焦成像模型 N_{cal} 进行互相关归一化计算，得到两类粒子图像间的相似性参数 C_m。在匹配计算过程中对映射关系进行迭代计算、插值优化，使高度与空间信息 z 与 C_m 的关系曲线更加平滑。C_m 值表示两个图像之间归一化互相关的局部峰值。将给定校准图像与校准子集图像进行互相关，创建整个先验高度信息内的下采样 C_m 预测轮廓堆栈，通过为堆栈中的每个 N_{cal} 校准图像创建下采样 C_m 轮廓来创建 C_m 预测模型示意图。

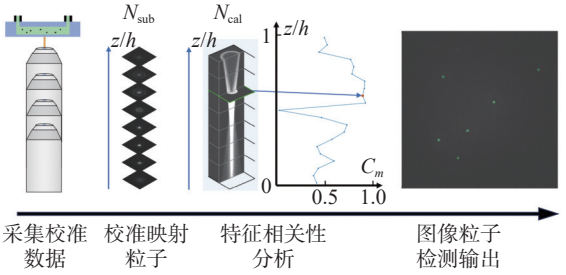


图 7 互相关粒子检测算法检测流程

Fig. 7 Flowchart of the cross-correlation particle detection algorithm

荧光粒子的匹配检测与计数。将实时采集图像输入到系统中。输入图像与校准子集图像进行信号图像的预处理与分割、互相关匹配，从而生成数值 C_m 的关系相关图。再设置相关阈值 C_m 的值（如 C_m=0.6），从大于该阈值的局部峰值的相关图中检测候选粒子。对于目标候选粒子，提取相关阈值 C_m 所代表的目标粒子轮廓，利用预测模型的先验信息堆栈进行匹配，以确定其具有高离散精度的 h/N_{cal} 深度信息，计算其是否处在观测体积 V_c 中，并计入荧光粒子检测数量，从而完成单分子免疫成像检测任务的检测计数需求。流动相单分子免疫检测系统的成像检测流程如图 8 所示。

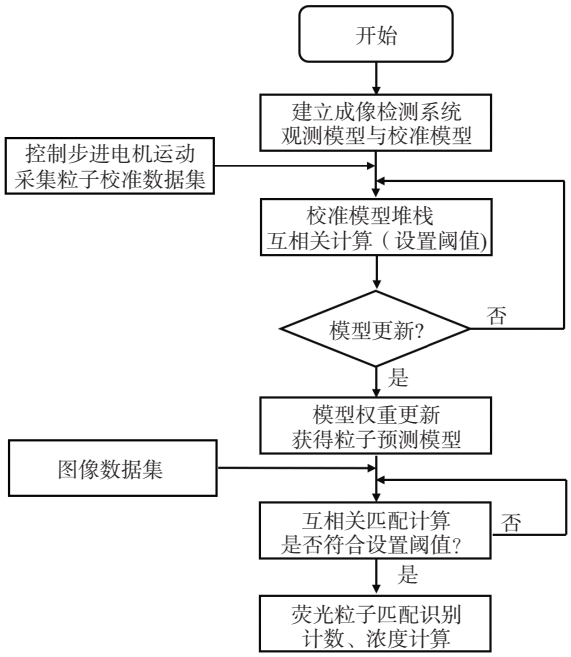


图 8　单分子免疫成像检测流程图

Fig. 8　Workflow of single-molecule immunoimaging detection

4　系统检测性能测试

4.1　流动相单分子免疫检测实验

为了测试流动相单分子免疫检测系统的检测性能, 本文针对同一批次的多种不同低浓度样本进行单分子免疫成像检测系统性能实验测试。对系统的样本反应量、检测下限、动态检测范围与精确度等参数进行测试。

首先, 使用稀土荧光微球对蛋白质单分子免疫样本进行标记, 制备母液样本并进行 1∶100 的初步稀释, 将样本分为 a、b 两份, 随后进一步稀释为多个不同浓度的亚样本(稀释倍率分别为 1∶5、1∶10、1∶30、1∶40、1∶50、1∶100、1∶500)。为了确保系统精度, 设定样品台 z 轴步进为 10 μm, 采集不同高度的粒子图像, 校准并优化图像匹配预测模型。

为确保系统检测过程的准确性, 将每种稀释样本分为 3 个独立批次进行检测。使用注射泵以 1 μL/min 的恒定流速将样本注入微流控芯片, 设定曝光时间为 50 ms, 图像以 20 帧/秒的速度采集 1 分钟。最后, 通过图像分析自动识别并计数荧光粒子, 根据粒子的平均数量计算单分子免疫标志物浓度, 完成定量分析。

以稀释倍率为 1∶500 的样本数据为例, 分析单分子免疫检测系统的检测过程。单次采集 2 048 pixel×2 048 pixel 图像数据共 1 200 张, 每张图像包含视场大小为 330 μm×330 μm、高度为 50 μm 待观测体积内的荧光粒子信号, 采集过程用时 180 s。系统采集单帧图像如图 9 所示。

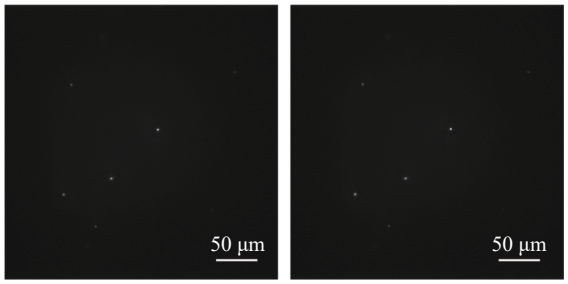
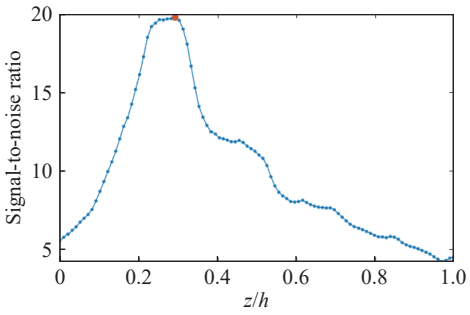


图 9　系统采集的单帧图像

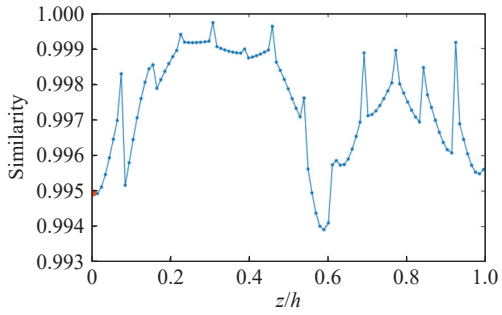
Fig. 9　Single-frame image captured by the proposed system

在离散数据校准过程中, 采集了 14 个不同高度焦面上的粒子映射数据, 并通过模型训练优化了各高度值 z 的迭代计算结果。该优化过程不仅改善了图像精度, 还生成了更为平滑的校准曲线, 从而提高了预测模型的准确性。得到不同高度 z 上荧光粒子的信噪比曲线与互相关峰值曲线, 如图 10 所示。



(a) 高度增加时信噪比变化曲线

(a) Variation curve of signal-to-noise ratio with increasing height



(b) 高度增加时互相关峰值变化曲线

(b) Variation curve of cross-correlation peak value with increasing height

图 10　不同高度上荧光粒子的信噪比与互相关峰值

Fig. 10　Signal-to-noise ratio and cross-correlation peak values of fluorescent particles at different heights

单分子免疫检测系统经过训练得到匹配预测模型，如图 11(彩图见期刊电子版)所示。

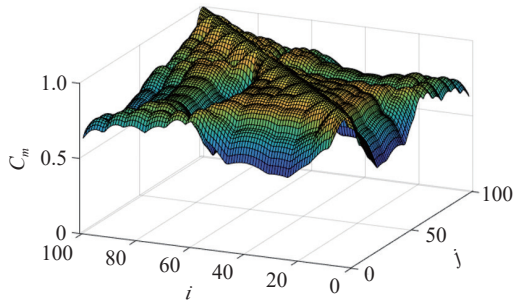


图 11 系统训练的匹配预测模型

Fig. 11 Matching prediction model trained by the proposed system

通过训练得到的匹配预测模型，能够实时处理采集到的图像数据。图像预处理、粒子信号分割与互相关匹配等流程有效提升了粒子识别的精度，如图 12 所示。最终，通过提取粒子的互相关数值 C_m，系统能够判断粒子是否符合检测要求，从而准确计入荧光粒子数量。

通过采集图像每一帧中的粒子数量与观测体积比值来计算样本的整体浓度，利用样本浓度完成定量分析。其表达式为:

$$C = \frac{N_{\mathrm{p}} \times P}{V_{\mathrm{c}}} \quad , \tag{13}$$

其中 N_{p} 为检测的粒子数量，P 为待检测蛋白质单分子的质量，V_{c} 为观测体积。

成像检测系统的检测结果如图 12 所示。

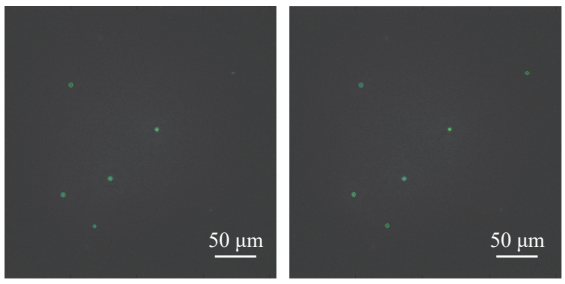


图 12 成像检测系统检测结果

Fig. 12 Detection results of the imaging detection system

结果表明该系统能够有效识别荧光粒子并进行计数分析，确保检测的准确性和稳定性。在检测过程中，光学系统误差、焦面微小偏移或样本流动稳定性等因素都会对荧光信号的采集产生一定影响。此外，信噪比和互相关匹配阈值的设置对粒子识别过程至关重要，过高的阈值可能导致部分弱信号粒子未能被有效检测。为进一步优化检测性能，可以通过调整匹配阈值、增强图像预处理算法以及提高信号提取的鲁棒性，以减少弱信号的丢失，提高系统对低浓度样本的检测能力，从而确保检测数据的可靠性和准确性。

4.2 单分子免疫检测实验结果分析

根据以上的检测流程与样本分析计算得到荧光成像检测系统的检测数据，实验结果如下。*a* 样本数据如表 1 所示。针对多种稀释倍率的样本进行单颗粒荧光信号的检测与计数。综合分析单次测量的粒子数量与稀释倍率间的量化关系。

表 1 *a* 样本荧光粒子检测结果

Tab. 1 Detection results of fluorescent particles in sample *a*

稀释倍率	a_1	a_2	a_3	平均值
1∶500	4.54	3.94	5.1	4.53
1∶1000	2.23	2.13	1.65	2
1∶3000	0.53	0.79	0.78	0.7
1∶4000	0.64	0.49	0.38	0.5
1∶5000	0.55	0.32	0.42	0.43
1∶10000	0.32	0.25	0.18	0.25
1∶50000	0.01	0.01	0	0.01

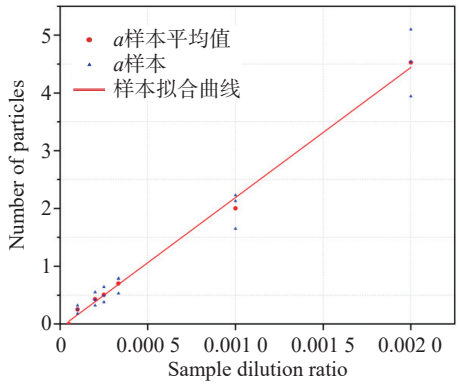
b 样本数据如表 2 所示。

表 2 *b* 样本荧光粒子检测结果

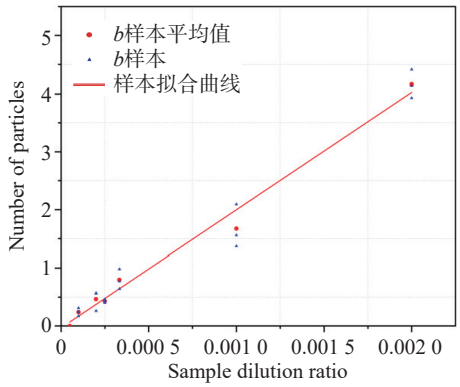
Tab. 2 Detection results of fluorescent particles in sample *b*

稀释倍率	b_1	b_2	b_3	平均值
1∶500	4.41	4.14	3.93	4.16
1∶1000	2.09	1.37	1.56	1.67
1∶3000	0.98	0.77	0.64	0.79
1∶4000	0.46	0.43	0.4	0.43
1∶5000	0.57	0.56	0.26	0.46
1∶10000	0.24	0.31	0.17	0.24
1∶50000	0	0.01	0	0

对单分子免疫检测结果进行数据分析与线性拟合，并综合考量单次测量的粒子数量与稀释倍率间的量化关系。结果如图 13(彩图见期刊电子版)所示。



(a) *a*样本检测结果分析
(a) Analysis of detection results for sample *a*



(b) b样本检测结果分析
(b) Analysis of detection results for sample *b*

图 13　数据拟合结果
Fig. 13　Data fitting results

根据实验结果与数据分析, 对本系统的性能进行详细评估, 并与单分子免疫检测领域的金标准—Simoa 系统进行对比, 评估其在样本反应量、检测下限、动态检测范围与精确度等方面的表现。Simoa 系统是目前公认的高灵敏度免疫检测平台, 广泛应用于各类生物标志物的定量分析, 尤其在低浓度样本检测方面具有显著优势[22]。对比结果如表 3 所示。

表 3　本文系统与 Simoa HD-X 系统性能对比
Tab. 3　Performance comparison between the proposed system and Simoa HD-X system

性能参数	Simoa系统	本系统
取样量	1 ~ 100 μL	1 ~ 100 μL
反应量	0.048 μL	0.2 ~ 1 μL
检测限	0.01 ~ 100 pg/mL	0.001 ~ 1 pg/mL
动态范围	≥4个数量级	≥3个数量级
精确度	CV<10%	CV<10%

针对现有单分子免疫检测设备存在的灵敏度较低、检测通量不足、检测流程繁琐等问题, 本系统通过方法革新与优化显著提升了检测性能。在灵敏度方面, 针对肿瘤疾病的 IL-6 指标, 本文通过引入流动相检测方式提高了检测通量, 并将反应量增至 0.2 uL, 使得检测下限提高至 0.001 ~ 0.002 pg/mL, 显著优于 Simoa 系统的 0.006 pg/mL, 从而大幅提升了灵敏度。系统在保持与 Simoa 系统相当的检测精度的基础上, 简化了检测流程, 显著缩短了样本取样和检测时间, 可在一小时内完成最多十份样本的检测。这一改进不仅有效规避了由于检测手段单一、样本稳定性差、检测流程不连续等因素所引起的问题, 还提高了检测效率, 满足了肿瘤疾病早期筛查对高通量、高精度检测的需求[23]。

此外, 本系统在降低仪器成本方面也具有明显优势。通过优化硬件配置与简化设计, 减少了系统的整体费用, 使得设备的购买和维护成本较传统高精度检测设备更低。这不仅降低了初期投资, 还减少了长期运营中的维护成本, 有利于推广应用于大规模筛查与基层医疗机构。而且该系统操作简便, 对操作者的培训要求较低, 减少了技术门槛, 进一步降低了普及应用的难度。

在检测通量方面, 本系统不仅保证了高灵敏度, 同时显著提升了样本处理能力和反应量, 能够有效支持大规模临床筛查。通过多次样本检测验证, 系统的稳定性和重复性得到了充分保证, 确保在不同环境和条件下依然能够提供可靠结果。标准品检测分析表明, 本系统的误差范围较小, 稳定性较强, 能够提供高度精确的检测数据。数据处理算法的优化进一步降低了噪声及非焦面荧光粒子的影响, 从而为早期疾病诊断提供了更加准确的数据支持。综上所述, 本系统为肿瘤早期筛查提供了一种更高效、精准的检测手段, 具有显著的临床应用价值。

5　结　论

为满足疾病早期诊断中的高灵敏度、操作连续和高通量检测需求, 本文提出了一种基于光学荧光成像的流动相单分子免疫检测方法, 根据样本规格设计了一套流动相单分子免疫检测系统。实现了 330 μm×330 μm 区域内发射波长为 614 nm 的免疫标志物样本的清晰成像, 并利用 GDPT 粒

子检测算法实现了 50 μm 高度内非焦面荧光粒子信号的处理与检测。实验结果表明，本系统在单分子免疫样本的检测下限可达 0.001 pg/mL，且在 0.001 ~ 1 pg/mL 的检测范围内，变异系数（CV）均小于 10%。可在一小时内完成最多十份样本的检测流程，多种免疫标志物样本的动态检测范围超过三个数量级。该系统在稳定性、灵敏度和高通量检测方面表现出色，满足单分子免疫检测的需求。本文所提检测方法应用前景广阔，特别是在癌症早期筛查领域具有重要的推广价值。

参考文献：

[1] 田丽丽, 杨新宇, 代小伟, 等. 免疫学检测联合痰涂片和痰培养检测在活动性肺结核临床诊断中的价值[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(10): 1073-1078.
TIAN L L, YANG X Y, DAI X W, *et al*.. Diagnostic value of immunological test combined with sputum smear and sputum culture in clinical diagnosis of active pulmonary tuberculosis[J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*, 2021, 43(10): 1073-1078. (in Chinese).

[2] 张雪洁, 汤家宝, 李廷栋, 等. 单分子免疫检测技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(4): 47-54.
ZHANG X J, TANG J B, LI T D, *et al*.. Advances in single molecule immunoassay[J]. *China Biotechnology*, 2021, 41(4): 47-54. (in Chinese).

[3] 周文超, 李政昊, 武杰. 单分子生物检测方法及应用研究进展[J]. 中国光学 (中英文), 2022, 15(5): 878-894.
ZHOU W CH, LI Z H, WU J. Research progress of single molecule biological detection methods and applications[J]. *Chinese optics*, 2022, 15(5): 878-894.

[4] WANG X, OGATA A F, WALT D R. Ultrasensitive detection of enzymatic activity using single molecule arrays[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(35): 15098-15106.

[5] COHEN L, WALT D R. Single-molecule arrays for protein and nucleic acid analysis[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2017, 10: 345-363.

[6] 彭孔浩, 白安琪, 孟颖, 等. 纳米材料传感器在有机磷农药残留检测中的研究进展[J]. 应用化学, 2024, 41(4): 472-483.
PENG K H, BAI A Q, MENG Y, *et al*.. Research progress of nanomaterial sensors in the detection of organophosphorus pesticide residues[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2024, 41(4): 472-483. (in Chinese).

[7] MACCHIA E, MANOLI K, HOLZER B, *et al*.. Single-molecule detection with a millimetre-sized transistor[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3223.

[8] HOLZMEISTER P, ACUNA G P, GROHMANN D, *et al*.. Breaking the concentration limit of optical single-molecule detection[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(4): 1014-1028.

[9] RISSIN D M, KAN C W, CAMPBELL T G, *et al*.. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(6): 595-599.

[10] POLLOCK N R, BANZ A, CHEN X H, *et al*.. Comparison of *Clostridioides difficile* stool toxin concentrations in adults with symptomatic infection and asymptomatic carriage using an ultrasensitive quantitative immunoassay[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2019, 68(1): 78-86.

[11] YELLESWARAPU V, BUSER J R, HABER M, *et al*.. Mobile platform for rapid sub–Picogram-per-milliliter, multiplexed, digital droplet detection of proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(10): 4489-4495.

[12] 兰艺凤, 侯博雅, 尉志文, 等. 基于截短适配体-二硫化钼纳米片信号增强免标记荧光检测金刚烷胺[J]. 分析化学, 2024, 52(2): 208-223.
LAN Y F, HOU B Y, WEI Z W, *et al*.. Based on truncated aptamer molybdenum disulfide nanosheets for signal enhanced label free fluorescence detection of amantadine[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 52(2): 208-223. (in Chinese).

[13] SU Y, ZHOU L. Review of single-molecule immunoassays: non-chip and on-chip assays[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1322: 342885.

[14] 陈佳鑫, 田秦秦, 何炜. 有机小分子探针对过氧亚硝酸根离子的荧光检测响应机理的研究进展[J]. 分析化学, 2024, 52(2): 166-177.
CHEN J X, TIAN Q Q, HE W. Research progress on the fluorescence detection response mechanism of organic small molecule probes for peroxynitrite ions[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 52(2): 166-177. (in Chinese).

[15] 岳斯琦, 莫展豪, 赵俊琪, 等. 基于表面增强拉曼散射特征峰位移检测触珠蛋白[J]. 分析化学, 2024, 52(2): 231-242.
YUE S Q, MO Z H, ZHAO J Q, *et al*.. Detection of haptoglobin based on surface enhanced Raman scattering characteristic peak shift[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 52(2): 231-242. (in Chinese).

[16] FARKA Z, MICKERT M J, PASTUCHA M, *et al*.. Advances in optical single-molecule detection: en route to supersensitive bioaffinity assays[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(27): 10746-10773.

[17] 尹娜, 王樱蒽, 张洪杰. 稀土纳米材料在脑肿瘤成像和治疗中的研究进展[J]. 应用化学, 2024, 41(3): 309-327.
YIN N, WANG Y H, ZHANG H J. Applications of rare earth-based nanoparticles in brain tumors[J]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2024, 41(3): 309-327. (in Chinese).

[18] ROSSI M, BARNKOB R. A fast and robust algorithm for general defocusing particle tracking[J]. *Measurement Science and Technology*, 2020, 32(1): 014001.

[19] HAIN R, KÄHLER C J, RADESPIEL R. Principles of a volumetric velocity measurement technique based on optical aberrations[C]. *Proceedings of the Conference on Imaging Measurement Methods for Flow Analysis*, Springer, 2009: 1-10.

[20] PEREIRA F, LU J, CASTAÑO-GRAFF E, *et al*.. Microscale 3D flow mapping with μDDPIV[J]. *Experiments in Fluids*, 2007, 42(4): 589-599.

[21] OLSEN M G, ADRIAN R J. Out-of-focus effects on particle image visibility and correlation in microscopic particle image velocimetry[J]. *Experiments in Fluids*, 2000, 29(S1): S166-S174.

[22] POORBAUGH J, SAMANTA T, BRIGHT S W, *et al*.. Measurement of IL-21 in human serum and plasma using ultrasensitive MSD S-PLEX® and Quanterix SiMoA methodologies[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2019, 466: 9-16.

[23] 杨马骏, 杨超杰, 贺月, 等. 多色免疫组织化学技术在肿瘤标志物分析中的研究进展[J]. 分析化学, 2024, 52(3): 313-322.
YANG M J, YANG C J, HE Y, *et al*.. Research progress of multi-color immunohistochemistry technology in tumor biomarker analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2024, 52(3): 313-322. (in Chinese).

作者简介：

高若谦(1993—), 男, 吉林长春人, 博士, 2020 年于中国科学院长春光学精密机械与物理研究所获得博士学位, 主要从事高光谱、成像光学等方面研究。E-mail: gaorq@sibet.ac.cn